

대두 철분결합단백질 유전자 발현 형질전환 감자의 감자무름병 방어 증진효과

배신철* · 여윤수 · 허성기¹ · 황덕주 · 변명옥 · 고승주

농업생명공학연구원, ¹농업과학기술원

Tolerance to Potato Soft Rot Disease in Transgenic Potato Expressing Soybean Ferritin Gene

BAE, Shin Chul* · YEO, Yun Soo · HEU, Sung Gi¹ · HWANG, Duk Ju · BYUN, Myung Ok · GO, Seung Joo

National Institute of Agricultural Biotechnology, RDA, Suwon 441-100, Korea

¹National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-100, Korea

ABSTRACT Ferritin is ubiquitous in bacteria, animals and plants. Ferritin is thought to play two main roles in living cells to provide iron for the synthesis of iron protein such as ferretoxin and cytochromes and to prevent damage from radicals produced by iron/dioxygen interaction. To enhance the resistance of potato to *Erwinia carotovora*, the soybean ferritin gene was introduced into the potato either under CaMV 35S or hsr203J promoter. Potato transgenic plants were screened by PCR analysis using specific primers to the ferritin gene. Expression of ferritin gene under CaMV 35S and hsr203J promoter in potato transgenic plants was confirmed by northern blot analysis. hsr203J promoter known to pathogen inducible in tobacco drives the induction upon *Phytophthora infestans* in potato and the transcript level of ferritin gene was extremely high after 24 hours post inoculation. One of transformants under CaMV 35S promoter was increased 2.5 fold than untransformant. Each one of transgenic potato containing gene promoter CaMV 35S and hsr203J-ferritin fusion exhibited tolerance against potato soft rot.

Key words: *Agrobacterium*, iron binding protein, potato, tolerance

서 론

식물은 대기중의 오존이나 이산화황, 자외선 등에 노출되거나 병원균에 감염되었을 때 hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide (O_2^-)와 hydroxy radical (OH^*) 등의 반응성 산소종 (reactive oxygen species; ROS)을 급속히 발생하는 것으로 알려져 있다 (Prince et al. 1989; Foyer et al. 1994; Lamb and Dixon 1997). 발생한 ROS 중에서, H_2O_2 는 식물세포내 유리 철분이 존재할 때 Fenton 반응 ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + H_2O + OH^*$)을 일으키며 이때 발생하는 OH^* 는 식물세포의 손상 및 핵산분해를 야기시킨다 (Henie and Linn 1997).

Ferritin은 세균에서 포유동물에 이르기까지 생물체에 널리 존재하는 철분결합 단백질이다 (Theil 1987). Ferritin이 세포

내 철분과 결합함으로써 철분 함량을 조절하게 되는데, 이러한 조절기능은 생물체내에서 두 가지 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 첫 번째는 ferredoxin과 cytochrome 등의 철단백질에 철분을 공급하는 것이며 두 번째는 세포내에 철분과 결합함으로써 철분에 인한 산화반응을 저해함으로써 OH^* 와 같은 강력한 반응성 산소종으로부터 세포의 손상을 방지할 수 있다 (Theil 1990). Deak 등 (1999)은 알팔파 ferritin 유전자를 담배에 형질전환하여 바이러스 (Tobacco necrosis virus), 곰팡이 (*Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*)에 대해 병 저항성 증진 효과를 보고한 바 있다. 이러한 ferritin의 조절기능을 이용하여 병원균 침입 시 발생하는 반응성 산소의 세포손상을 방지할 수 있는 가능성을 조사하고자 본 실험에서는 대두 (soybean)의 ferritin 유전자를 감자 수미품종에 형질전환하였다. 형질전환용 promoter로는 병원균 침입 시에만 유전자 발현을 유도하는 담배 유래 hsr203J promoter (Pontier et al. 1998)와 ferritin 유전자를 항시 발현시킬 때 병 저항성 정도를

*Corresponding author Tel 031-299-1714 Fax 031-299-1712

E-mail scbae@rda.go.kr

비교하기 위하여 CaMV 35S promoter를 대조 promoter로 사용하여 감자 세균병원균에 대한 저항성 검정을 실시하였다.

재료 및 방법

식물재료

현재 농가에서 장려품종으로 사용되고 있는 수미품종의 감자 (*Solanum tuberosum* L. cv. Superior)를 형질전환 대상작물로 하였으며, 25°C 배양실에서 MSO [MS salt (Murashige and Skoog 1962) + 3% sucrose] 배지에 3~4주간 배양된 감자의 줄기를 형질전환 재료로 이용하였다.

형질전환 재조합 DNA의 구축 및 균주

대두 ferritin 유전자는 한경대학교 강권규교수로부터 분양 받았으며, CaMV 35S promoter-ferritin 유전자의 형질전환용 재조합 DNA 제작과정은 *HindIII*, *BamHI*으로 처리된 pBI221 벡터(Clontech, USA)로부터 CaMV35S promoter를 분리하여 양쪽 말단을 blunt end 형성한 후, *SmaI*으로 절단된 ferritin 유전자를 연결하였다. *hsr203J* promoter-ferritin 유전자의 형질전환용 재조합 DNA 제작과정은 *SalI*으로 절단된 *hsr203J* promoter와 ferritin 유전자를 연결한 후 이들 각각 재조합 DNA를 *PinII* terminator가 삽입된 pCAMBIA3300 binary 벡터의 *SacI* 제한효소 site에 연결하였다 (Figure 1). 감자 형질전환 균주는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 이용하였다.

감자의 형질전환

감자 형질전환은 Chakraborty (2000) 방법에 준하여 실시하였고 배지의 호르몬 조성과 phosphinothricin (PPT) 농도를 변

형하여 형질전환에 이용되었다. MSO 배지에서 자란 감자 줄기 절간을 1 cm 크기로 자른 후, 1일간 28°C 배양된 *Agrobacterium* 200 µL 배양액을 15 mL MS액체 배지에 희석하여 사용하였다. 균 희석액에 10분간 감자 줄기조직을 감염시킨 후 MSO배지에서 48시간 암상태에서 공동 배양하였다. *Agrobacterium*에 감염된 줄기조직을 캘러스 유도배지 (BA 5 mg/L, NAA 0.1 mg/L, GA₃, 1.0 mg/L PPT 1.0 mg/L)에서 캘러스를 유기한 후 발근 유도를 위하여 BA 5 mg/L, NAA 0.1 mg/L, GA₃, 1.0 mg/L PPT 1.0 mg/L이 첨가된 MS배지에서 배양하여 뿌리를 형성하였다. 선발마크로 사용된 PPT의 최적 농도를 선정하기 위하여 캘러스 유도배지에 PPT를 0~5 mg/L 농도로 첨가하여 *bar* 유전자 발현 감자와 일반 감자의 줄기를 대상으로 40일간 배양하였다. 일반감자의 줄기세포가 고사하는 PPT의 적정농도를 선정하여 형질전환 식물체 선발에 이용하였다.

PCR 및 Northern Blot 분석

1.0 mg/L의 PPT가 첨가된 선발배지에서 배양된 감자식물체의 유전자 도입을 확인하기 위하여 PCR을 수행하였다. 감자식물체의 게놈 DNA 분리는 DNeasy plant system (Qiagen, USA)를 이용하였으며, PCR 증폭을 위한 primer는 ferritin 유전자의 양쪽 말단부위 primer (정방향 5'-CGCGTCGACATG-GCTCTTGCTCCATCC-3', 역방향 5'-CGCGAGCTCC-TAATCAAGAAGTCTTTGATC-3')를 이용하였다. PCR 반응 조건은 95°C에서 5분간 반응 후, 95°C 30초, 58°C 30초, 72°C 2분간 35회 반복 실시하였다.

Northern 분석에 사용될 total RNA 분리는 TRIzol reagent (Gibco BRL, USA)를 사용하였다. 분리된 10 µg total RNA를 1.2% formaldehyde agarose gel에서 전기영동한 다음 capillary transfer 방법으로 nylon membrane에 전이시켰다. Probe로 이용될 ferritin 유전자는 위에서 언급된 5', 3' 양쪽 말단 primer를 이용하여 PCR로 DNA를 증폭한 후 [α -³²P]dCTP를 표식하였다. Hybridization은 68°C의 6× SSC, 2× Denhart's reagent, 0.1% SDS 용액에서 24시간 반응시킨 후, 상온의 1× SSC, 0.1% SDS 용액으로 20분간 세척한 다음, 68°C의 0.2× SSC, 0.1% SDS 용액 (Sambrook and Russell 2001)으로 10분간 3회 세척하였다.

형질전환체의 감자무름병 저항성 검정 및 철분 함량 측정

배양실에서 PPT로 선발된 형질전환 감자를 온실로 옮겨 괴경을 형성하여 수확하였다. 감자무름병 저항성 검정을 위하여 수확된 microtube를 두께 3 mm, 반경 15 mm로 잘라 28°C에서 1일간 배양된 감자무름병균 (*Erwinia carotovora* pv. *atroseptica*)을 1×10⁵ cfu/mL 되게 희석한 후 접종하였다. 접종한 감자괴경은 포화수분 상태에서 28°C, 12시간 배양 후 괴저병반의 크기를 측정하였다. 감자괴경의 철분 함량 측정은

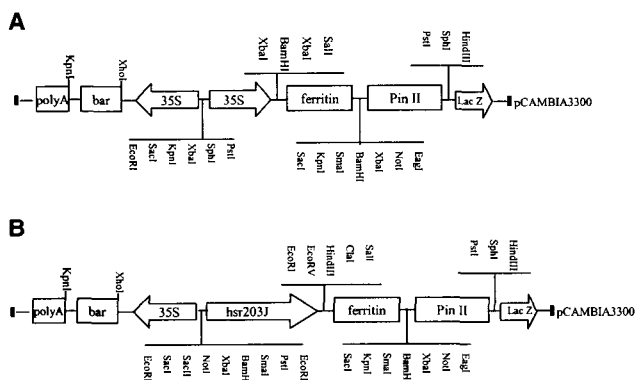


Figure 1. Construction of the expression vector, pCAMBIA-ferritin. The ferritin gene was fused into CaMV 35S (A) and *hsr203J* (B) promoter. CaMV 35S promoter (0.74 kb); ferritin coding region (0.84 kb); 3' *pinII* (1.0 kb); *bar* coding region (0.59 kb); 3' polyA (0.28 kb)

ICP (GBC scientific equipment, Australia) 분석기기를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

감자형질전환체 선발 및 Ferritin 유전자 발현

bar 유전자가 도입된 형질전환 캘러스 선발을 위한 PPT 적정농도를 결정하기 위하여 PPT 농도를 0~5 mg/L로 처리한 결과 1 mg/L 이상 첨가된 배지에서 일반 감자의 줄기 절단면에서는 캘러스가 형성되지 않고 최종적으로 고사하였기에 재조합 DNA 유전자 삽입 여부를 결정하는 PPT 적정 농도를 1 mg/L로 선정하였다 (Figure 2). 캘러스 배지에서 배양 후 2주경부터 줄기조직의 절단면으로부터 캘러스가 형성되었으며 4주경에 캘러스를 절단하여 shoot배지로 옮겼다. Shoot 형성 효율을 높이기 위하여 NAA 0.1 mg/L, GA₃, 1.0 mg/L, PPT 1.0 mg/L가 첨가된 shoot배지에 Benzylaminipurine (BA) 호르몬을 1~5 mg/L 농도로 처리한 결과 1 mg/L보다 5 mg/L를 배지에 첨가하였을 때 shoot 형성이 효과적이었다 (결과 미제시). CaMV 35S promoter에 연결된 재조합 DNA 형질전환 식물체는 15계통을 선발하였으며 *hsr203J* promoter 재조합 DNA 형질전환 식물체는 22계통을 선발하였다.

이들 재분화 식물체의 유전자 도입을 확인하기 위하여 형질전환 식물체로부터 genomic DNA를 분리하여 PCR 증폭을 하였다. Figure 3에서 나타난 바와 같이 0.84 kb에서 DNA 증폭산물을 확인할 수 있었다. 두 종류의 재조합 DNA 형질전환 식물체에 대하여 전사체 수준에서 유전자가 발현되는지를 확인하기 위하여 항시 발현 promoter인 CaMV 35S에 연결된 ferritin 유전자 재조합 DNA 형질전환 감자를 포트로 이식하여 2개월 후 감자 잎을 대상으로 전사체 발현을 확인하였다. Ca/Fe4를 제외한 4계통 형질전환 감자에서는 전사체가 발현되는 것을 확인할 수 있었으며, Ca/Fe4의 발현 정도는 매우

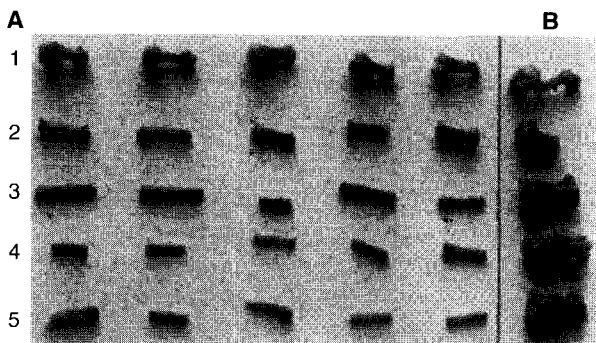


Figure 2. Effect of phosphinothricin on callus formation from node of potato on callus inducing medium. A, untransformed potato node; B, *bar* transformed potato node; lane 1, PPT 0 mg/L; lane 2, 1 mg/L; lane 3, 1.5 mg/L; lane 4, 2 mg/L; lane 5, 5 mg/L.

적었다. *hsr203J* promoter는 담배와 담배 풋마름균 (*Ralstonia solanacearum*)의 불친화적 상호반응 (incompatible interaction)에 의해 유도되는 담배 유래 promoter이다 (Pontier et al. 1994). *hsr203J* promoter 유전자에 연결된 대두 ferritin 유전자가 병원균에 의해 감자에서 유도 발현되는지를 확인하기 위하여 감자역병균을 접종한 후 12, 24, 48시간 후 잎을 채취하였다. 병원균 접종 후 12시간 후 형질전환 4계통 모두 ferritin 유전자 전사체 발현이 시작되었으며 24시간 후 발현량이 가장 많았고 그 후 48시간에는 감소하였다 (Figure 4). 이러한 결과는 Pontier (1998) 등이 발표한 담배 풋마름균 침입시 *hsr203J* promoter에 의해 유도되는 전사체의 발현시기와 유사하였다. 이것은 담배 유래 병원균 특이발현 벡터 유전자가 감

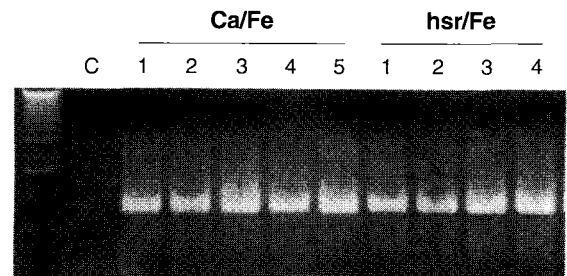


Figure 3. Identification of transformants of potato plants using genomic PCR amplification. lane Ca/Fe1, 2, 3, 4, 5, transformants of CaMV 35S promoter-ferritin gene; lane hsr/Fe1, 2, 3, 4, transformants of *hsr203J* promoter-ferritin gene.

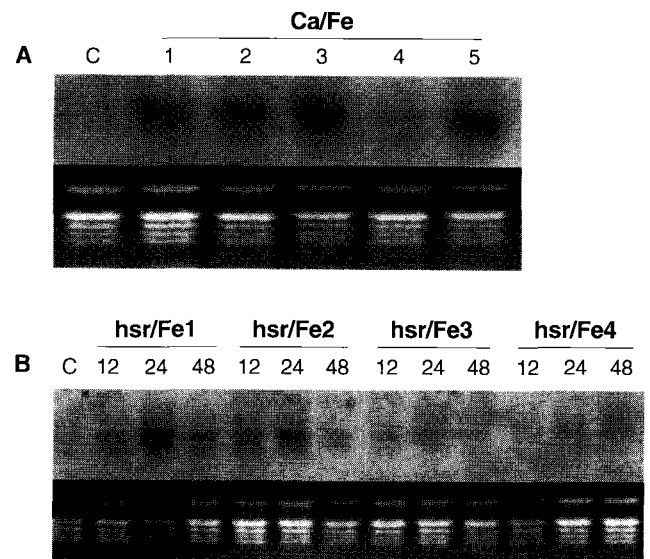


Figure 4. Northern blot analysis of transgenic potato plants under the control CaMV 35S (A) and *hsr203J* (B) promoter-ferritin gene. Total RNA under the control of CaMV 35S promoter was isolated from the leaves of transgenic potato plants and total RNA under the control of *hsr203J* promoter was isolated from transgenic potato leaves harvested 12, 24 and 48 hours after inoculation of *Phytophthora infestans*. Panel A: lane Ca/Fe1, 2, 3, 4, 5, transformants of CaMV 35S promoter-ferritin gene. Panel B: lane hsr/Fe1, 2, 3, 4, transformants of *hsr203J* promoter-ferritin gene.

자에서도 병원균 특이발현 기능을 수행할 수 있다는 것을 시사한다. Figure 4의 대조구에서 전사체가 발현되지 않는 것은 내재하는 ferritin 유전자는 정상적인 환경 조건하에서는 극도로 발현량이 제한적이지만 토양속의 철분에 의한 전사체가 유도 발현되기 때문에 (Van der Mark et al. 1983) 본 실험의 대조구에서는 전사체가 검출이 되지 않는 것으로 생각된다.

형질전환 감자의 세균병균 방어 증진효과

PCR 및 Northern 분석으로 유전자 발현이 확인된 형질전환체 감자괴경에 대한 철분 함량을 측정하였다. CaMV 35S-ferritin 유전자 도입 형질전환체는 대조구에 비해 철분함량 증가가 2.5배 정도 증가하였다 (Figure 5). 이러한 증가 정도는 glutelin promoter를 이용한 ferritin 비 형질전환체 철분함량 증가와 유사한 수준이었다 (Goto et al. 1999). hsr203J promoter-ferritin 유전자 도입 형질전환체는 약 1.5배 증가한 것으로 나타났다. CaMV 35S-ferritin 유전자 도입 형질전환체와 비교해 볼 때 이러한 철분함량의 차이는 hsr203J promoter가 biotic stress에 의해 작동되기 때문인 것으로 생각된다. 감자괴경에 대해 감자 무름병에 대한 병 저항성 실험에서는 Ferritin 유전자를 보유하는 두종류의 재조합 DNA 형질전환 감자는 전반적으로 병반 크기가 줄어드는 경향을 나타냈으며 (Figure 6A), 특히 Ca/Fe2와 hsr/Fe2의 형질전환체는 3번의 반복실험 결과 대조구에 비해 2.5~3배 정도 병반 크기가 줄어든 것을 확인하였다 (Figure 6B). 이것은 식물의 손상을 야기하는 OH^{*} 생성에 관여하는 유리철분을 대두의 ferritin 단백질이 결합함으로써 감자의 항산화력을 향상시켜 감자무름병에 대한 방어력이 증진되었다고 생각한다.

적 요

식물의 항산화력을 증진하여 식물병원균 저항성 작물을 개

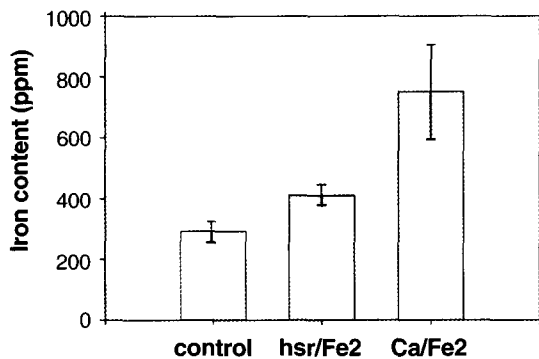


Figure 5. Comparison of iron content in transgenic potato tubers of CaMV 35S and hsr203J promoter-ferritin gene. Ca/Fe2, transformants of CaMV 35S promoter-ferritin gene; hsr/Fe2, transformants of hsr203J promoter-ferritin gene.

발하고자, 철분 결합 단백질인 대두의 ferritin 유전자를 CaMV 35S와 hsr203J promoter에 연결하여 감자에 형질전환하였다. PCR 및 Northern 분석에 의한 형질전환 감자에 ferritin 유전자가 존재하는 것과 이들 유전자 식물체내에서 발현되는 것을 확인하였다. ferritin 유전자를 담배 유래 병원균 특이 발현 promoter인 hsr203J와 연결하여 획득된 형질전환 감자 식물체는 감자역병균 접종 후 24시간대에서 전사체 발현량이 가장 많았으며 그 후 줄어드는 경향을 나타내었다. 유전자 도입이 확인된 형질전환체 감자괴경의 철분 함량은 CaMV 35S와 ferritin 유전자 도입 형질전환체가 2.5배, hsr203J promoter와 ferritin 유전자 도입 형질전환체가 1.5배 각각 증가하는 것으로 나타났다. 또한 이들 형질전환체는 감자 무름병균에 대한 저항성 증진효과를 관찰할 수 있었다.

사사 - 본 논문 수행을 위한 ferritin 유전자를 제공하여 주신 한경대학교 강권규 교수님과 pCAMBIA3300 binary 벡터를 제공하여 주신 농업생명공학연구원 박범석 박사님 또한 감자역병균 접종에 협력하여 주신 농업과학기술원 지형진 박사님과 감자 철분 함량 측정에 도움을 주신 농업과학기술원 장병준 박사께 감사함을 전해 드립니다.

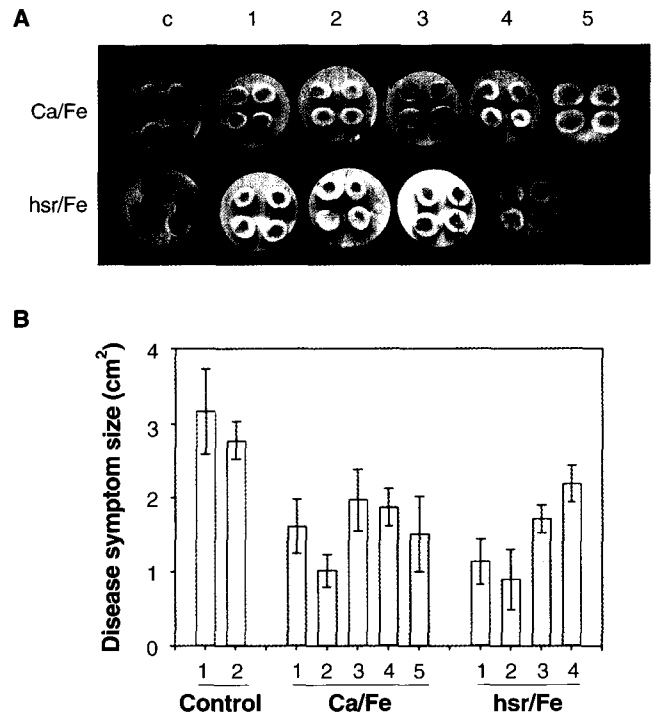


Figure 6. Soft rot disease tolerance (A) and comparison of symptom size (B) in transgenic potato tubers of CaMV 35S and hsr203J promoter-ferritin gene. lane Ca/Fe1, 2, 3, 4, 5, transformants of CaMV 35S promoter-ferritin gene; lane hsr/Fe1, 2, 3, 4, transformants of hsr203J promoter-ferritin gene.

인용문헌

- Chakraborty S, Chakraborty N, Datta A** (2000) Increased nutritive value of transgenic potato by expressing a nonallergenic seed albumin gene from *Amaranthus hypochondriacus*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:3724-3729
- Deak M, Horvath GV, Davletova S, Torok K, Sass L, Vass I, Barna B, Kiraly Z, Dudts D** (1999) Plants ectopically expressing the iron binding protein, ferritin, are tolerant to oxidative damage and pathogens. *Nature Biotechnology* **17**:192-196
- Foyer CH, Descouvieres P, Kunert, KJ** (1994) Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ* **17**:507-523
- Goto F, Yoshihara T, Shigemoto N, Toki S, Takaiwa F** (1999) Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nature Biotechnology* **17**:282-286
- Henie EF, Linn S** (1997) Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J Biol Chem* **272**:19095-19098
- Lamb C and Dixon RA** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol and Plant Mol Biol* **48**:251-275
- Murashige T, Skoog** (1962) Effect of media plant growth regulators on germination of somatic embryos of *Aralia elata* S. *Kor J Med Crop Sci* **2**:241-245
- Pontier D, Godiard L, Marco Y, Roby D** (1994) hsr203J a tobacco gene whose activation is rapid, highly localized and specific for incompatible plant/pathogen interaction. *Plant J* **5**:507-521
- Pontier D, Tronchet M, Rogowsky P, Lam E, Roby D** (1998) Activation of hsr203, a plant gene expressed during incompatible plant-pathogen interactions, is correlated with programmed cell death. *Mol. Plant Microbe Interact* **3**:417-423
- Prince AH, Atherton NM and Headry GAF** (1989) Plant under drought stress generate activated oxygen. *Free Rad Res Commun* **8**:61-68
- Sambrook J, Russell D.W** (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third ed. Cold Spring Harbor, NY.
- Theil EC** (1987) Ferritin structure, gene regulation and cellular function in animals, plants and microorganism. *Annu Rev Biochem* **56**:289-315
- Theil EC** (1990) Regulation of ferritin and transferrin receptor mRNA. *J Biol Chem* **265**:4771-4774
- Var der Mark F, Bienfait F, Van den Ende H** (1983) Variable amounts of translatable ferritin mRNA in beans leaves with various iron contents. *Biochem Biophys Res Commun* **115**:463-469

(접수일자 2002년 10월 11일)